

# **Exhibit 5**



# SIPO

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.C.

[HOME](#) | [ABOUT SIPO](#) | [NEWS](#) | [LAW & POLICY](#) | [SPECIAL TOPIC](#) | [CHINA IP NEWS](#)
[>>\[Patent Search\]](#)

<b>Title:</b> Polyglycol modified recombinant human interferon			
<b>Application Number:</b>	01134085	<b>Application Date:</b>	2001.10.25
<b>Publication Number:</b>	1375502	<b>Publication Date:</b>	2002.10.23
<b>Approval Pub. Date:</b>		<b>Granted Pub. Date:</b>	
<b>International Classification:</b>	A61K38/21, A61P31/12, C07K14/555, C08G65/34		
<b>Applicant(s) Name:</b>	Nanjing Pharmacy Univ.		
<b>Address:</b>	210009		
<b>Inventor(s) Name:</b>	Yao Wenbing, Yang Xiaobing		
<b>Attorney &amp; Agent:</b>	huang jiadong		
<b>Abstract</b>			
<p>The recombinant human interferon modified by polyethylene glycol is characterized by that on the recombinant human interferon one or two or more than two polyethylene glycol chains can be connected, said recombinant human interferon can be interferon alpha 2b, and the average degree of polymerization of said polyethylene glycol chain is 45-230. Said invented recombinant human interferon has the physiological activity of the interferon, and its stability is superior to that of interferon, its plasma clearance is low, the half-life period in vivo is long, it can be used for preparing the medicines for resisting virus and resisting cancer. Said invention also discloses its preparation method.</p>			

Copyright © 2007 SIPO. All Rights Reserved

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/555

C08G 65/34 A61K 38/21

A61P 31/12

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01134085.1

[43] 公开日 2002 年 10 月 23 日

[11] 公开号 CN 1375502A

[22] 申请日 2001.10.25 [21] 申请号 01134085.1

[71] 申请人 南京药科大学

地址 210009 江苏省南京市童家巷 24 号

[72] 发明人 姚文兵 杨晓兵 吴梧桐

田 焱 林碧蓉

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 黄嘉栋

权利要求书 7 页 说明书 7 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 聚乙二醇修饰重组人干扰素

[57] 摘要

一种聚乙二醇修饰的重组人干扰素,它是重组人干扰素上连接有一条,或者二条或二长以上的聚乙二醇链。上述的重组人干扰素可以是干扰素  $\alpha 2b$ 。上述的聚乙二醇链的平均聚合度  $n$  为 45-230。本发明的聚乙二醇修饰的重组人干扰素具有干扰素的生理活性,而稳定性优于干扰素,它的血浆清除率低,体内半衰期长,可用于制备抗病毒、抗癌等药物,本发明公开了聚乙二醇修饰的重组人干扰素的制法。

## 权利要求书

1. 一种聚乙二醇修饰的重组人干扰素，其特征是重组人干扰素上连接有一条，或者二条或二条以上的聚乙二醇链。
2. 根据权利要求1所述的聚乙二醇修饰的重组人干扰素，其特征是重组人干扰素是干扰素 $\alpha$  2b。
3. 根据权利要求1所述的聚乙二醇修饰的重组人干扰素，其特征是聚乙二醇链的平均聚合度 $n$ 为45-230。
4. 一种制备权利要求1所述的聚乙二醇修饰的重组人干扰素的方法，其特征是在干扰素 $\alpha$ 的溶液中加入碱溶液，调节pH值至7.5-9.5，然后加入碳酸单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺酯，在0-15℃下进行反应，将反应混合液进行色谱分离，得聚乙二醇单修饰的重组人干扰素和聚乙二醇多修饰的重组人干扰素。
5. 根据权利要求4所述的制备方法，其特征是干扰素 $\alpha$ 加入碳酸单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺酯后的反应时间不少于15分钟。
6. 根据权利要求4所述的制备方法，其特征是反应混合液进行色谱分离，色谱条件是采用Superdex 75 Highload制备型凝胶色谱柱，流动相为含NaCl的磷酸盐缓冲液。
7. 根据权利要求1所述的聚乙二醇修饰的重组人干扰素的用途，其特征是制备抗病毒药物。

## 说 明 书

## 聚乙二醇修饰重组人干扰素

## 一、技术领域

本发明涉及一种干扰素，具体地说是一种聚乙二醇修饰的干扰素。

## 二、背景技术

蛋白质药物临床应用的安全性和有效性一直是人们关注和研究的热点。蛋白质药物由于稳定性差，血浆清除率高，体内半衰期短，易产生抗原抗体反应，因此在临床治疗中受到很大的限制。因此研究人员采用了各种药物传递技术来提高蛋白质药物的疗效，包括采用不同的给药途径（如口服，鼻腔给药，透皮吸收），不同的载体（如微球，脂质体，红细胞，单克隆抗体），不同高分子材料（如多糖），不同药物释放技术（如控释缓释技术，前药）。而目前在药物传递技术中研究最为广泛的就是聚乙二醇[Poly(ethylene glycol), PEG]修饰技术；这是近二十年来发展起来的一种用于改进蛋白质类药物体内药动学性质的新技术，它将活化的聚乙二醇分子键合到蛋白质分子表面上，影响蛋白质的空间结构，最终导致蛋白质各种生物化学性质的改变。研究证实，通过共价键用 PEG 来修饰蛋白质表面的氨基酸残基可以有效提高血浆半衰期，减少给药次数，还可以降低蛋白质的免疫原性 [参见：Katre NV. The conjugation of proteins with polyethylene glycol and other polymers: Altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential. *Adv Drug Delivery Reviews* 10, 1993: 91-114; Nucci ML, Shorr R, Abuchowshi A. The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 6, 1991: 133-151; Zalipsky S. Chemistry of poly(ethylene glycol) conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16, 1995: 157-182; Inada Y, Furukawa M, Sasaki H et al. Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins. *Focus*, 1995: 13: 86-91.]。

早在十年前，重组 IFN- $\alpha$  就被 FDA 批准用于多毛细胞白血病的治疗，目前它的适应症覆盖了很大一块治疗领域，在临床上主要应用于病毒性肝炎、抗癌、

急性传染病、免疫功能低下和 IFN 缺乏综合症的治疗[胡天兵, 梁文素. 干扰素的临床应用. 医药导报, 2000;19 (1), 71: ]。但目前临床上使用的由大肠杆菌产生重组的 IFN- $\alpha$  2b 同样具有体内半衰期短的缺点, 且具有抗原性, 副作用较为明显。如何获得缓释、长效形式的干扰素, 改善它的药物动力学以提高耐受性及给药便利程度, 一直是研究的重点。

目前大多数的研究是将多肽分子中的氨基作为修饰位点。制备蛋白质和聚乙二醇结合物的最常用的方法是利用 PEG 活化后形成的亲电子基团和蛋白质上的氨基进行反应, 反应后可以在一个球蛋白分子上共价连接数个聚合物长链, 聚合物长链的数目取决于蛋白质分子上可供结合的位点数(自由氨基和其他亲电子基团)、修饰剂的化学性质, 修饰剂的过量比例及反应条件。PEG 的衍生物大致有芳化试剂(含氯化芳基基团, 可以与蛋白质上的亲核基团反应)、酰化试剂(含酰基, 与蛋白质通过酰氨键相连)或烷化试剂(与蛋白质上的氨基形成仲氨连接)。

### 三、发明内容

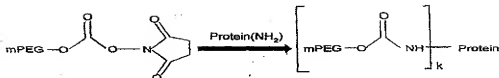
本发明是将重组人干扰素用聚乙二醇长链修饰。

本发明的具体的技术方案如下:

一种聚乙二醇修饰的重组人干扰素, 它是重组人干扰素上连接有一条, 或者二条或二条以上的聚乙二醇链。上述的重组人干扰素可以是干扰素  $\alpha$  2b。上述的聚乙二醇链的平均聚合度  $n$  为 45-230。

本发明的聚乙二醇修饰的重组人干扰素的制备方法是: 在干扰素  $\alpha$  的溶液种, 加入磷酸氢二钠溶液, 调节其 pH 值至 7.5-9.5, 然后加入碳酸二甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺酯在 0-15℃ 下进行反应, 反应时间不少于 15 分钟, 将反应混合液进行色谱分离, 采用 Superdex 75 Highload 制备型凝胶色谱柱, 流动相为含 NaCl 的磷酸盐缓冲液, 色谱分离可得聚乙二醇单修饰的重组人干扰素和聚乙二醇多修饰的重组人干扰素。

02.02.04



Scheme : Use of SC-mPEG for attachment of mPEG to proteins

mPEG:  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 

本发明的聚乙二醇修饰的重组人干扰素的用途是用于制备抗病毒药物、抗癌药物、及治疗免疫功能低下和 IFN 缺乏综合症的药物。

本发明的聚乙二醇修饰的重组人干扰素能够基本保持干扰素的抗病毒活性，同时它又比未修饰的重组人干扰素有较好的热稳定性和酶稳定性，它的血浆清除率低，体内半衰期长，肝脏积蓄能力强，因此作为抗病毒、抗癌等素药物，它比未修饰的重组人干扰素有更大的优越性。本发明的聚乙二醇修饰的重组人干扰素的制备方法，简单易行。

#### 四、附图说明

图 1 是 SDS-PAGE 电泳检测图，其中 1 为天然干扰素；2 为蛋白质分子量的标样；3 为干扰素峰；4 为单甲氧基聚乙二醇单修饰的重组人干扰素峰；5 为单甲氧基聚乙二醇多修饰的重组人干扰素峰。

图 2 是干扰素  $\alpha$  2b 和单甲氧基聚乙二醇修饰的干扰素  $\alpha$  2b 在鼠的肝脏中分布的比较。

图 3 是用  $^{125}\text{I}$  标记法研究修饰后干扰素药代动力学的流程图。

#### 五、具体实施方式

##### 实施例 1 碳酸单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺酯 (SC-mPEG) 的制备

称取 6g 单甲氧基聚乙二醇 5000，三光气 0.56g，溶于甲苯 20ml 和二氯甲烷 12ml 中，逐滴加入无水三乙胺 1ml，搅拌反应过夜。将反应液抽真空，挥去大部分溶剂，将所得残渣重新溶解于甲苯 8ml 和二氯甲烷 10ml 中。加入羟基琥珀酰亚胺 0.21g，取三乙胺 0.3ml，用二氯甲烷 3ml 稀释，逐滴加入反应液中，继续反应完全后，将反应液过滤并抽真空，所得残渣溶解于 50℃ 乙酸乙酯 60ml 中，过滤，冷却后所得结晶即 SC-PEG 粗品。将所得产物用乙酸乙酯反复重结

晶。测定产品的红外光谱,有如下特征峰: 1812, 1789 ( $\text{C}=\text{O}$ , 琥珀酰亚胺); 1742 ( $\text{C}=\text{O}$ , 羧基); 1114 ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ )。测定产品的核磁共振光谱 ( $^1\text{H-NMR}, \text{CDCl}_3$ ), 有如下特征峰: 4.35 ( $\text{m}, 4\text{H}, \text{CH}_2\text{OCO}_2$ ); 3.55 (s,  $\sim 500\text{H}$ , PEG); 2.74 (s,  $8\text{H}, \text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ )。

### 实施例 2 SC-PEG 对干扰素的修饰条件的选择

反应时间的选择: 取干扰素浓缩液 1ml (0.9mg/ml), 加入 0.2M 的磷酸氢二钠溶液调节 pH 值至 7.5-8.5, 取 0.2ml 分别置于 4 支带塞试管中。每支试管分别加入 0.1mg 的 SC-PEG 反应 15min、30min、1h、2h 后终止反应, 进行 SDS-PAGE 电泳。比较修饰率, 确定修饰条件。结果表明, 反应 15 分钟是修饰率较低, 大部分干扰素没有被修饰, 反应 30 分钟时修饰率有所提高, 产物以修饰一条和两条链的干扰素为主, 反应 1-2 小时, 图谱条带无明显差异。

反应 pH 值的选择: 取干扰素浓缩液 1ml (0.9mg/ml), 各取 0.2ml 分别置于 3 支带塞试管中, 加入 0.2M 的磷酸氢二钠溶液调节 pH 值至 7.5、8.5、9.5, 每支试管分别加入 0.1mg 的 SC-PEG 反应 1h 后终止反应, 以 HPLC 检测。确定修饰反应的 pH 值。结果表明当 pH 为 7.5 时修饰率过低, 大部分干扰素没有被修饰, 而 pH 9.5 时修饰过度, 多于两条链的修饰产物较多, 且不均一, 不利于保持干扰素的活性。

### 实施例 3 修饰产物的分离纯化与鉴定

取干扰素  $\alpha 2b$  原液 50ml (0.09mg/ml), 将其 pH 值调至 8.5, 再加入 SC-mPEG 固体 80mg, 溶解, 混匀, 于  $4^\circ\text{C}$  反应 1h, 加入 2g 甘氨酸固体终止反应。

取上述反应液 10ml, 上柱分离。色谱条件: Superdex 75 Highload 制备型凝胶色谱柱 ( $26 \times 600\text{mm}$ ,  $22-24 \mu\text{m}$ ), 柱体积 320ml, 流动相为含 0.15M NaCl 的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.18), 流速 1.5ml/min, 检测波长 215nm。收集各洗脱峰。结果表明, 分子量大于标准干扰素的洗脱峰有两个, 分别为单修饰干扰素和多修饰干扰素。

将各洗脱峰适当浓缩, 采用 SDS-PAGE 电泳检测, 分离胶 15%, 浓缩胶 5%。结果见图 1, 其表明各分离组分呈单一条带。



实施例 4 修饰后各组分的抗病毒活性测定 [中华人民共和国卫生部. 中国生物制品规程一部. 一九九五年版. 北京: 中国人口出版社, 1995:268-269.]

用 Wish 细胞(人羊膜传代细胞)-VSV 病毒(滤泡性口腔炎病毒)系统测定各洗脱峰的抗病毒活性。采用 CPE(细胞致病变应)抑制为基础的抑制微量测定法, 以每毫升干扰素检品的最高稀释度仍能保护半数细胞(50%)免受病毒攻击的稀释度的倒数为干扰素单位。以国际单位 (IU) 表示, 并用国家 IFN $\alpha$  标准品进行校正。结果见表 1。

Tab 1. Antiviral Activity of Conjugates of IFN $\alpha$  2b and SC-mPEG.

Samples	Specific Activity
	(IU/mg)
Unmodified IFN $\alpha$ 2b	$45.5 \times 10^7$
Mono-mPEG-IFN $\alpha$ 2b	$47.4 \times 10^6$
Poly-mPEG-IFN $\alpha$ 2b	$1.5 \times 10^6$

#### 实施例 5 修饰后干扰素体外稳定性的研究

热稳定性: 取 IFN、mono-mPEG-IFN、poly-mPEG-IFN 各 1mlIU, 分别置于 4℃、25℃、37℃条件下, 定时取样测定干扰素的抗病毒活性。结果表明, 干扰素 $\alpha$  2b 在 37℃下 2h 内活性不变, 单修饰干扰素 $\alpha$  2b 在 4-6h 内能够维持 90% 的活性, 多修饰干扰素 $\alpha$  2b 在 4-6h 内能够维持活性不变。25℃时干扰素 $\alpha$  2b 在 1 天内能够活性不变, 单修饰干扰素 $\alpha$  2b 在 2 天以上能够维持 90% 的活性, 而多修饰干扰素 $\alpha$  2b 在 2-4 天内能够维持活性不变。干扰素 $\alpha$  2b 在 4-6 天内可以保持活性不变。而单修饰干扰素 $\alpha$  2b8-10 天, 多修饰干扰素 $\alpha$  2b18-24 天, 维持抗病毒活性不变(上述稳定性试验是在液体状态, 无任何保护剂的条件下进行的)。因此, 可以初步认为聚乙二醇修饰可以明显增加干扰素 $\alpha$  2b 的热稳定性。

酶稳定性: 取 0.1%胰蛋白酶溶液 (pH7.84) 2.7ml, 各加入 0.3mlIFN、

mono-mPEG-IFN、poly-mPEG-IFN 样品, 25℃保温, 于 0, 20, 40, 60, 90min, 3, 4, 5, 6h 取样 0.3ml; 测定干扰素的抗病毒活性。结果表明, 干扰素  $\alpha$  2b 在 3-5min 内活性迅速降到原来的 50%, 而单修饰干扰素  $\alpha$  2b 在 10-15min, 多修饰干扰素  $\alpha$  2b 在 15-30min。因此, 聚乙二醇修饰能够明显增强干扰素  $\alpha$  2b 抵抗耐胰蛋白酶水解的能力。

人血清中的稳定性: 结果表明, 在 37℃下, 干扰素  $\alpha$  2b 3h 内, 单修饰干扰素  $\alpha$  2b 6h 内, 而多修饰干扰素  $\alpha$  2b 12h 内, 保持活性不变。

#### 实施例 6 修饰后干扰素药代动力学研究 ( $^{125}\text{I}$ 标记法)

主要参数包括: (1) 半衰期, (2) 体内分布

干扰素  $\alpha$  2b 和单修饰干扰素  $\alpha$  2b 的药代动力学参数的计算: 将  $^{125}\text{I}$ -干扰素  $\alpha$  2b 的全血的血药浓度与  $^{125}\text{I}$ -单修饰干扰素  $\alpha$  2b 的全血的血药浓度进行校正后, 经计算机拟合, 结果符合一级消除动力学的二房室模型, 即  $C(t) = A \cdot e^{-\lambda_1 t} + B \cdot e^{-\lambda_2 t}$ , 计算各动力学参数(表 2)。曲线下面积 (AUC 与剂量 (D) 成线性关系。 $^{125}\text{I}$ -干扰素  $\alpha$  2b 的 AUC 对剂量 D 的回归方程:  $\text{AUC} = 1.003 + 2.888 \cdot D$  ( $r = 0.994, n = 3$ );  $^{125}\text{I}$ -单修饰干扰素  $\alpha$  2b 的 AUC 对剂量 D 的回归方程:  $\text{AUC} = -0.379 + 2.212 \cdot D$  ( $r = 0.9992, n = 3$ )。

组织分布: 除了肾脏(干扰素  $\alpha$  2b 的主要代谢器官)以外,  $^{125}\text{I}$ -单修饰干扰素  $\alpha$  2b 在其他各组织中的分布比  $^{125}\text{I}$ -干扰素  $\alpha$  2b 的高, 因此可以认为聚乙二醇修饰可以提高干扰素  $\alpha$  2b 在组织中的利用率。 $^{125}\text{I}$ -干扰素  $\alpha$  2b 的总体分布: 胃 > 肾 > 肺 > 脾 > 肝 > 心 > 脑, 而  $^{125}\text{I}$ -单修饰干扰素  $\alpha$  2b 的总体分布: 胃 > 肝 > 肾 > 脾 > 肺 > 心 > 脑。聚乙二醇修饰明显改变干扰素  $\alpha$  2b 的体内分布比例, 特别是聚乙二醇修饰干扰素  $\alpha$  2b 在肾脏的分布降低, 而在肝脏的分布增加。从图 2 可以看出, 在不同时间点  $^{125}\text{I}$ -单修饰干扰素  $\alpha$  2b ( $^{125}\text{I}$ -mono-PEG-IFN  $\alpha$  2b) 在肝脏的分布明显高于  $^{125}\text{I}$ -干扰素  $\alpha$  2b ( $^{125}\text{I}$ -IFN- $\alpha$  2b)。 $^{125}\text{I}$ -单修饰干扰素  $\alpha$  2b 的含量为干扰素  $\alpha$  2b 的 4-10 倍。

02.02.04

Tab.2 Pharmacokinetic parameters of  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\alpha$  2b and  $^{125}\text{I}$ -mono-PEG-IFN- $\alpha$  2b after i.v. injection in rats (n=8)

	$^{125}\text{I}$ -IFN $\alpha$ 2b			$^{125}\text{I}$ -PEG-IFN $\alpha$ 2b		
	1 $\mu\text{g/kg}$	3 $\mu\text{g/kg}$	5 $\mu\text{g/kg}$	1 $\mu\text{g/kg}$	3 $\mu\text{g/kg}$	5 $\mu\text{g/kg}$
A(pg/ml)	8187	24679	48495	6805	21136	37025
B(pg/ml)	1231	4158	9087	1250	4124	7911
$\alpha$ (h $^{-1}$ )	17.14	17.17	16.85	23.47	20.92	20.66
$\beta$ (h $^{-1}$ )	0.6811	0.7582	0.9595	0.2545	0.2187	0.2578
$k_{21}$ (h $^{-1}$ )	2.83	3.12	3.35	3.86	3.60	3.85
$k_{12}$ (h $^{-1}$ )	10.86	10.64	9.63	18.31	16.27	15.69
$k_{10}$ (h $^{-1}$ )	4.13	4.17	4.83	1.55	1.27	1.38
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.0404	0.0404	0.0411	0.0295	0.0331	0.0335
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.02	0.914	0.665	2.72	3.17	2.69
Vd(L/kg)	10.63	10.40	8.39	12.4	11.88	11.13
Vd(L/kg)	64.46	57.20	42.24	75.58	68.99	59.58
AUC	$2.25 \times 10^4$	$6.918 \times 10^5$	$1.381 \times 10^6$	$1.932 \times 10^5$	$6.060 \times 10^5$	$1.078 \times 10^6$
(pg $\cdot$ h/ml)						
CL(ml/h $\cdot$ kg)	0.443	0.433	0.362	0.518	0.495	0.464

#### 实施例 7

用单甲氧基聚乙二醇 2000 或单乙氧基聚乙二醇 10000 代替实施例 1 中的单甲氧基聚乙二醇 5000, 得到与以上实施例 1-5 相似的结果。

01.10.29

# 说明书附图

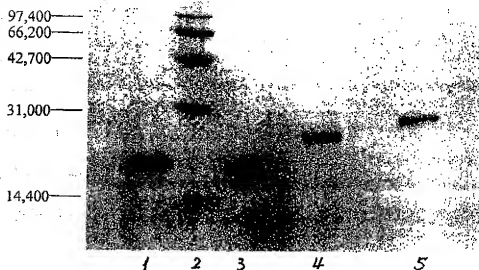


图 1

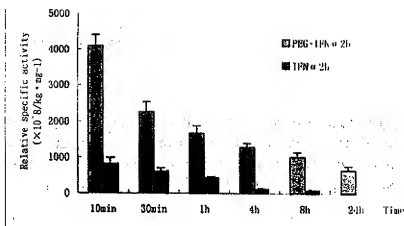


图 2

02.02.04

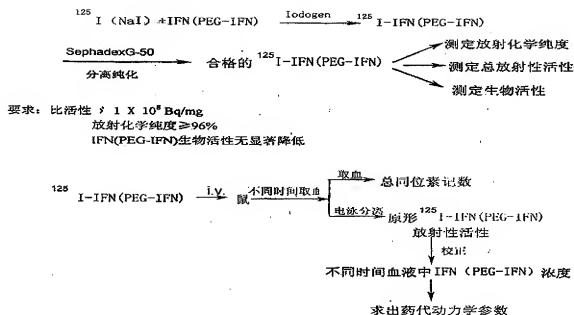


图 3